تشخیص جهش‌های گیرنده FLT3 شامل تضاعف توالی داخلی و جهش نقطه‌ای اسید آسپارتیک D835 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد

*دکتر فرهاد ذاکر I
محمد حسین محمدی II
دکتر احمد کاظمی III
معصومه بخشایش IV

چکیده

زمینه و هدف: اساس مولکولی لوسمی میلوئیدی حاد (Acute Myeloid Leukemia - AML)، موتاسیون در ژن‌های تنظیم‌کننده تکثیر و تمایز سلولی می‌باشد .جهش در ژن گیرندهٔ تیروزین کینازی FLT3 از شایع‌ترین جهش‌های ایجادشده در AML می‌باشد که موجب تکثیر و بقاء غیرطبیعی سلول‌های لوکمیک می‌شود. وجود جهش تضاعف توالی داخلی ITD (Internal Tandem duplication) و همچنین جهش نقطه‌ای D835 ژنFLT3 یک پیش‌آگهی بد را به همراه دارند. هدف از این مطالعه تشخیص و تعیین فرکانس این جهش‌ها در بیماران مبتلا به AML بود.

روش بررسی: ۱۰۱ بیمار مبتلا به AML با روش مشاهده‌ای- توصیفی از نظر جهش ITD در اگزون ۱۱ و ۱۲ و اینترون ۱۱و جهش نقطه‌ای D835 در اگزون ۲۰ ژن گیرنده FLT3 با استفاده از تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) مورد مطالعه قرار گرفتند. جهش ITD بعد از حرکت باند حاصل از PCR ژن گیرنده FLT3 روی ژل آکریلامید ۸٪ ، و مقایسه با مارکر بر روی این ژن مشخص گردید. در مورد جهش نقطه‌ای D835، بعد از PCR روی DNA ژنومیک این بیماران، محصولات به دست آمده با استفاده از آنزیم محدودالاثر ECORV و تکنیک RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: جهش ITD در ۱۸٪ مبتلایان به AML مورد مطالعه، مشاهده گردید که برای زیرگروه‌های مختلف طبقه‌بندی FAB این نتایج متفاوت بود. ٦٪ هم ، جهش نقطه‌ای D835 داشتند که توزیع آن‌ها در زیرگروه‌های مختلف FAB یکسان نبود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که جهش‌های ژن گیرنده FLT 3، درصد قابل توجهی از بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد را شامل می‌شود که می‌توان با تشخیص مولکولی این جهش‌ها قبل از شروع درمان، در مورد پروتکل درمانی صحیح تصمیم گرفت.

کلیدواژه‌ها: ۱- لوسمی میلوئیدی حاد، ۲- ژن گیرنده تیروزین کینازیFLT3، ۳ـ تضاعف توالی داخلی ٤- اسید آسپارتیک (D835)، ۵- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

لوسمی میلوئیدی حاد با افزایش تعداد میلو بلاست‌ها و سلول‌های نارس در مغز استخوان و خون محیطی همراه است و عوامل مختلفی در ایجاد آن دخیل هستند که جهش‌های تأثیرگذار در تکثیر و تمایز سلولی از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد. ژن گیرنده FLT3 (گیرنده تیروزین کینازی شبه - FMS) که اغلب تحت عنوان flk-2 (کیناز کبدی جنینی-2) شناخته می‌شود، از گیرنده‌های خارج سلولی پیشسازهای خونی و متعلق به خانواده گیرنده‌های تیروزین کینازی کلاس III (RTKIII) می‌باشد که از۵ ناحیه شبه ایمنوگلوبولین در قسمت خارج سلولی و یک ناحیه کینازی در قسمت داخل سلولی تشکیل شده و این دو قسمت توسط ناحیه غشا گذر به هم متصل می‌شود[۱و۲]. این ژن، در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۳ (13q12,2) قرارگرفته و در سلول‌های خونساز نابالغ، جفت، گنادها و مغز بیان می‌شود[۳]. این گیرنده با سایر تیروزین کینازها از قبیل KIT و PDGFR مشابهت دارد.[٤و۵] بروز زیاد ژن گیرنده FLT3 در حدود ۷۰٪ تا ۱۰۰٪ از موارد AML و

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه آقای محمدحسین محمدی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد هماتولوژی با راهنمایی دکتر فرهاد ذاکر و مشاوره دکتر احمد کاظمی، سال ۱۳۸۵.

I) دانشیار و متخصص هماتولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه‌های شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران (*مؤلف مسؤول)
II) کارشناس ارشد هماتولوژی، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران
III) دانشیار و متخصص هماتولوژی، گروه هماتولوژی، دانشگاه پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران
IV) کارشناس ارشد انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

در درصد بالایی از موارد ALL (لوسمی لمفوئیدی حاد) اتفاق می‌افتد[۶-۸]. لیگاند FLT3 (FL) هم در اکثریت رده‌های سلولی بیان می‌شود[۹]. جهش‌ها در ژن گیرنده FLT3 بیشترین فراوانی نقص ژنتیکی را شامل می‌شوند که در لوسمی میلوئیدی حاد تعریف شده‌اند. اصلی‌ترین این جهش‌ها، جهش شناخته شده تضاعف توالی داخلی (ITD)و جهش نقطه‌ای در موقعیت D835 می‌باشند. نتیجه این جهش‌ها، فعالیت تیروزین کینازی مداوم و پایدار گیرنده FLT3 بدون تحریک به وسیله لیگاند است که تکثیر مستقل از فاکتور رشد دارند.[۱۰و۱۱]

جهش ITD حدود ۲۵٪-۲۰٪ از موارد AML را شامل می‌شود. جهش نقطه‌ای D835 هم در اگزون ۲۰ ژن گیرنده FLT3 در موقعیت اسید آمینه آسپارتیک اسید 835 است؛ که حدوداً در ۱۰-۶٪ بیماران AML مشاهده می‌شود.[۱۲و۱۳] به دلیل پیش‌آگهی بد در بیماران مبتلا به AML دارای جهش در ژن گیرنده FLT3، تحقیقات زیادی روی توسعه داروهای بازدارنده فعالیت تیروزین کینازی FLT3 وجود دارد.[۱۳] تضاعف توالی داخلی ITD دراگزون[۱۱و۱۲] و اینترون ۱۱ اتفاق می‌افتد و بین ۹ تا ۱۸۰ نوکلئوتید (۳ تا ۶۰ اسید آمینه) در این نواحی افزوده می‌شود که باعث افزایش طول ژن می‌گردند.[۱۴-۱۶]

با توجه به گفته‌های فوق و اینکه تاکنون مطالعات چندانی بر روی این جهش‌ها در ایران انجام نشده است، هدف از انجام این پژوهش اجرائی کردن تشخیص جهش‌های گیرنده FLT3 در میان افراد مبتلا به AML بود.

روش بررسی

نمونه‌های خونی تعداد ۱۰۱ نفر از بزرگسالان مبتلا به AML با زیرگروه‌های مختلف طبقه‌بندی FAB تهیه شده از بخش خون بیمارستان‌های دکتر شریعتی و مرکز فلوسیتومتری سازمان انتقال خون (که مراکز رفرانس هستند) با روش مشاهده‌ای- توصیفی مورد مطالعه قرار گرفتند. از این نمونه‌ها، جهت استخراج DNA از تکنیک پروتئیناز K و استات آمونیوم اشباع استفاده شد. لوله‌های حاوی خون تا زمان تخلیص DNA در فریزر نگهداری می‌شوند. برای تشخیص ITD از DNA ژنومیک استخراج شده، با استفاده از پرایمرهای (زیست باران) ۱۰μM

GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC- ۵'
Forward primer: و Reverse primer
-CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC- ۵'

و مطابق برنامه Initial denaturation PCR یک دوره به مدت ۵ دقیقه در ۹۵°c وسی سیکل تکراری که هر سیکل شامل denaturation به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵°C و annealing ۱ دقیقه در۶۶°C و elongation به مدت ۹۰ ثانیه در ۷۲°C و در پایان final elongation به مدت ۷ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. قبل از شروع PCR، master mix (سینا ژن) شامل (50mM, dNTP2mM Buffer10X, Mgcl2) و Taq polymerase ۵ $\frac{U}{\mu l}$ (واحد در میکرولیتر) (سینا ژن) و (۲۰۰-۵۰۰ $\frac{ng}{\mu L}$) DNA در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (μl) تهیه شد. پس از PCR، با مشاهده مستقیم و مقایسه باندها با مارکر Gene Ruler^{Tm} ۵۰ bp DNA Ladder (سینا ژن) بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۸٪ به مدت ۴-۳ ساعت در ولتاژ ۱۵۰ وجود جهش ITD بررسی شد. در مورد جهش نقطه‌ای D835، با استفاده از پرایمرهای ۱۰μlM (زیست باران) ۵' reverse primer ۳' CCC-GCA GCC TCA CAT TGC و Forward primer ۳' -CCG CCA GGA ACG TGC TTG- ۵' و مطابق برنامه PCR و مواد ذکر شده در بالا (در مورد جهش ITD) ژنوم استخراج شده بیماران تکثیر شد. برای یافتن جهش نقطه‌ای D835 و براساس تکنیک RFLP و با استفاده از آنزیم ECORV (۱۰ u/μl) (سیناژن) به مقدار ۱μl به ازای هر ۲۶μl از محصولات PCR و ۳μl R buffer (سیناژن) به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور

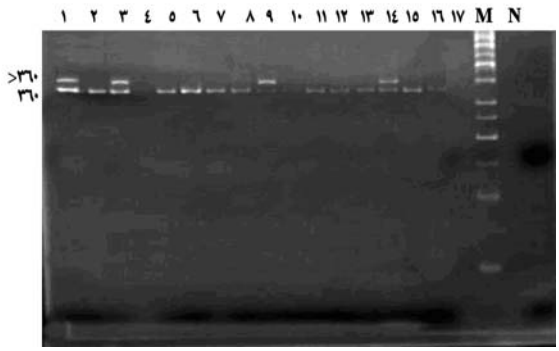
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

گذاشته و در دمای ۳۷°C انکوبه می‌شوند. سپس محصولات RFLP را در روی ژل پلی‌آکریلامید ۸٪ در ولتاژ ۱۳۰ به مدت ۲ ساعت الکتروفورز می‌شوند. پس از رنگ‌آمیزی در اتیدیوم برماید و سپس شستشو با آب مقطر، وضعیت ژل‌ها بررسی شده و نمونه‌ها جهت مطالعه و برای عکسبرداری در دستگاه UV قرار داده می‌شوند. در صورت وجود جهش و یا عدم آن، باندهای مختلف قابل مشاهده است.

یافته‌ها

الف: بررسی تضاعف توالی داخلی (ITD)

از ۱۰۱ بیمار مبتلا به AMLمورد بررسی در این مطالعه با زیرگروه‌های مختلف FAB (به جزء M6 و M7) ۱۸٪ تضاعف توالی داخلی (ITD) را داشتند، که ۱۶٪ آن‌ها زیرگروه M_3 بودند. در شکل شماره ۱ تعدادی از این افراد دیده می‌شوند که در مورد آن‌ها بعد از هر شکل توضیح داده شده است.



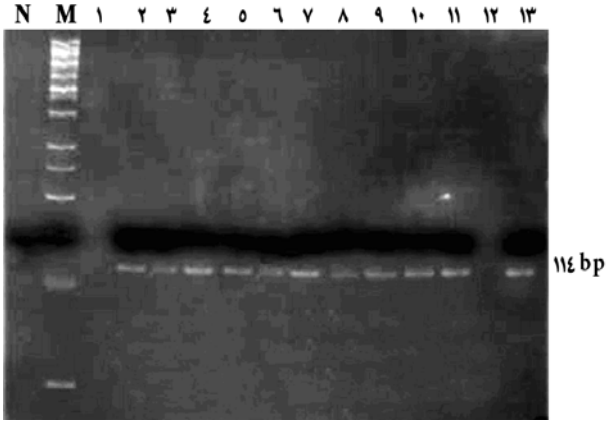
شکل شماره ۱- جهش ITD در ژن FLT3 در زیرگروه‌های مختلف بیماران AML N = Negative control M = Marker

در شکل شماره ۱ با توجه به مارکر، قطعات ۳٦۰ bp دیده می‌شوند که مربوط به اگزون ۱۱ و۱۲ واینترون ۱۱ ژن FLT3 می‌باشد. نمونه‌های فوق مربوط به زیرگروه‌های متنوع طبقه‌بندی FAB هستند که ستون ۱ و ۳ نمونه بیماران AML زیرگروه M3 هستند که جهش در آن‌ها دیده می‌شود. ستون ۹ مربوط به بیمار AML-M2 و ستون شماره ۱٤ مربوط به بیمار AML-M4 می‌باشد.

در تمام این موارد با شرایط یکسان و پرایمرهای اختصاصی واحد، ۲ قطعه مختلف باند تکثیر شده است که باند پایین‌تر (۳٦۰bp) مربوط به کلون نرمال سلول‌ها و باند بالایی (< bp ۳٦۰) مربوط به کلون سلول‌های جهش یافته لوسمیک است؛ که در توالی داخلی اگزون ۱۱ و ۱۲ واینترون ۱۱، تضاعف و جایگزینی اتفاق افتاده و طول این ناحیه را از ۳٦۰bp بالاتر برده است.

ب: بررسی جهش نقطه‌ای D835

از ۱۰۱بیمارمبتلا به AML، میزان ٦٪ جهش نقطه‌ای (D835) را داشتندکه فقط در بیماران M2 و M3 و M5 این جهش مشاهده شد. باندهای موجود در شکل شماره شماره ۲، محصولات PCR اگزون ۲۰ (محل وقوع D835) را قبل از مواجه با آنزیم محدودالاثر ECORV در تعدادی از این افراد را نشان می‌دهد



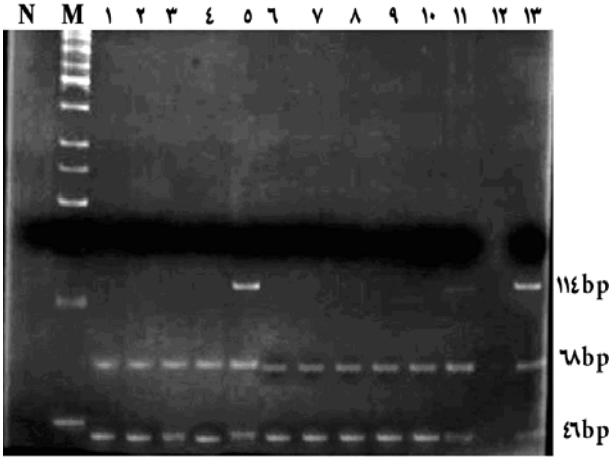
شکل شماره ۲- تایید PCR ژن طبیعیFLT3 (اگزون ۲۰)که جهش نقطه‌ای D835 در این ناحیه اتفاق می‌افتد (مرحله قبل از اضافه کردن آنزیم) M = Marker N=Negative control

در شکل شماره ۳ محصولات PCR شدهٔ اگزون ۲۰ ژن FLT3 دیده می‌شوند که بر اساس تکنیک RFLP، آنزیم ECORV به آن‌ها اضافه شده است.

همان‌گونه که مشاهده می‌شود در تمام نمونه‌ها برش DNA اتفاق افتاده؛ به جز در ستون‌های شماره ۵ و ۱۳ که در مقداری از محصولات برش DNA حادث نشده است. در حقیقت قطعات ۱۱٤ bp از محصولات PCR شده، که به دو

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

قطعه ٦٨ bp و ٤٦ bp برش داده شده‌اند، نشان می‌دهد که در این نمونه‌ها جهش اتفاق نیفتاده است و مکان برش آنزیم که ('٥...GAT ATC...'٣) تغییر نکرده و آنزیم به‌راحتی محصولات PCR را به دو قطعه کوچک‌تر به صورت کامل تقسیم کرده است، ولی در بیماران شماره ٥ و ١٣ باندهای مختلف دیده می‌شود که باند بالایی همان باند ١١٤ bp است که به دلیل وجود جهش مکان برش آنزیم تغییر نموده و آنزیم قادر به برش DNA نبوده است که نشان‌دهنده وجود جهش نقطه‌ای D835 است. دو باند پایین‌تر یعنی ٦٨ bp و ٤٦ bp، ژن‌های کلون نرمال سلول در فرد مبتلا AML هستند، که جهش در این کلون‌ها اتفاق نیفتاده است.



شکل شماره ٣- مشاهده جهش D835 در ژن FLT3 درزیرگروه‌های مختلف بیماران AML (مرحله بعد از اضافه کردن آنزیم)
M = Marker N=Negative control

بحث

جهش‌های FLT3 در پاتوژنز لوسمی‌ها، به خصوص AML اهمیت بسزایی دارند و منجر به تکثیر خارج از کنترل سلول‌های لوسمیک می‌شوند. تضاعف توالی داخلی (ITD) و جهش نقطه‌ای (D835)در ژن گیرنده FLT3 منجر به فعال شدن گیرنده، بدون تحریک به واسطه لیگاند (FL) می‌شوند. جهش ITD در بعضی مطالعات به همراه شمارش لکوسیتی بالا، پرگنوز بد و لوسمی مقاوم به درمان گزارش شده است[١٧]. هر چند D835 بر خلاف ITD با لکوسیتوز همراه نیست، اما اندکی به سمت یک پرگنوز بد گرایش دارد[١٨].

در این مطالعه برای یافتن میزان بروز جهش‌های تضاعف توالی داخلیITD و جهش نقطه‌ای D835 با تکنیک PCR و RFLP، ١٠١ فرد بزرگسال مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد مورد مطالعه قرار گرفتند. از ١٠١ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد، ١٨٪ تضاعف توالی داخلی را نشان دادند که پراکندگی یکسانی در زیرگروه‌های FAB نداشتند. بیشترین موارد در زیرگروه M3 مشاهده شد. در این مطالعه، مورد مثبتی از وجود جهش ITD در بیماران زیرگروه M0 و M1 و M5 دیده نشد.

بررسی این پژوهش نشان می‌دهد که جهش‌های FLT3/ITD در حدود ١٨٪ از لوسمی میلوئیدی حاد بزرگسالان اتفاق می‌افتد و تعدادی نوکلئوتید اضافه و یا تکرار می‌شود و درنتیجه وجود هر تعداد از اسید آمینه اضافی باعث تغییر شکل فضایی پروتئین شده و نهایتاً اثر ناحیه مجاور غشایی پروتئین را در جلوگیری از فعالیت اتوفسفوریلاسیون گیرنده از بین می‌برد. این تکرارها می‌توانند در اگزون ١١ و ١٢ و اینترون ١١ از ژن FLT3 باشد و یا در مرز مشترک بین اگزون و اینترون ١١ اضافه شوند.[١٩و٢٠]

ترکیبی از همه مطالعاتی که تا امروز گزارش شده است شامل فراوانی کلی از FLT3/ITD در AML بزرگسالان در ٣٨٥ مورد از ١٥٩٥ بیمار (حدود ٢٤٪) بوده است. گزارش‌های دیگر حاکی از آن است که FLT3/ITD در ٢٠٪ تا ٣٠٪ موارد AML و همچنین D٨٣٥ در ٧٪ تا ١٠٪ این بیماران رخ می‌دهد[١٨و٢١]. FLT3/ITD در همه زیرگروه‌های FAB با بیشترین نسبت در AML-M3 دیده شده است که با مطالعه حاضر منطبق می‌باشد. کمترین میزان در AML-M2 گزارش شده است[٢١و٢٢]. البته در گزارش‌های مختلف، این توزیع یکسان نیست، و به طور کلی جهش‌های FLT3/ITD در بزرگسالان اغلب با یک پیش‌آگهی بد دلالت دارد[٢٣-٢٥].

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

همچنین، جهش اگزون ۲۰ ژن گیرنده FLT3 بررسی شد که دومین جهش از نظر فراوانی است. در ۱۰۱ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد تحت مطالعه، در ٦٪ این جهش شناسایی شد، و در افراد M1، M0 و M4 این جهش مشاهده نشد. به دلیل کم بودن میزان جهش و همچنین بیماران مورد مطالعه این پژوهش، به طور دقیق نمی‌توان رابطه‌ای بین وجود این جهش و زیرگروه‌های FAB تعریف کرد. جایگزینی D835 در ۳۰ مورد از ٤۲۹ بیمار مبتلا به AML (۷٪)، ۱ مورد از ۲۹ بیمار مبتلا به MDS (حدود ۳٪) و ۱ مورد از ۳٦ بیمار مبتلا به ALL (۳٪) مشاهده شده است[۱۸و۲٦]. در یک گزارش مشابه، ۷ مورد از ۳۵ بیمار مبتلا به AML (۷٪) این جهش را داشته‌اند.[۲۷] در مطالعه حاضر، فراوانی درصد جهش D835 منطبق با گزارش‌های دیگران می‌باشد.

بروز جهش نقطه‌ای D835 به طور معنی‌داری کمتر از تضاعف توالی داخلی (ITD) در ژن FLT3 می‌باشد، ولی هر دو جهش با فراوانی بالایی در AML یافت می‌شوند، که در مطالعه حاضر مجموعاً ۲٤٪ موارد را شامل شده است. اگرچه در مطالعه‌ای حاضر مواردی از وجود هر دو جهش، تضاعف توالی داخلی (ITD) و جهش نقطه‌ای (D835) در ژن FLT3 در یک بیمار یافت نشد، ولی حضور این دو جهش در یک بیمار قبلاً گزارش شده است که البته با مطالعات تعیین توالی (sequencing) مشخص شده که این دو جهش بر روی یک آلل مشابه نبوده‌اند. بر خلاف جهش‌های تضاعف توالی داخلی (ITD)، در مورد جهش نقطه‌ای D835 و استخلاف‌های گوناگون آن اثرات پیش‌آگهی آن‌ها به طور معنی‌داری ثبت نشده است. به دلیل فراوانی بالای جهش در ژن FLT3 (به خصوص ITD) یک تمرکز شدید بر روی داروهای بازدارنده فعالیت FLT3 تیروزین کنازی جهش یافته وجود دارد که علاوه بر داروهای رایج در پروتکل‌های استاندارد رایج در درمان AML، داروهایی از قبیل CEP-701 تا حدود ۹٤٪ در مورد بیماران دارای جهش ITD و ۲۷٪ در موارد دارای جهش D835 اثر بازدارندگی بر تکثیر سلول‌های لوسمیک و در نتیجه درمان AML دارند[۲۸]. از محدودیت‌های انجام این پژوهش، عدم دسترسی به پرونده بیماران جهت یافتن بعضی از اطلاعات آزمایشگاهی آن‌ها بود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که جهش‌های ژن گیرنده FLT3 درصد قابل توجهی از بیماران مبتلا به AML را شامل می‌شود. در پایان اینکه پیگیری مناسب جهش‌های (ITD, D835) در ژن گیرنده FLT3 و اجرائی کردن روش‌های تشخیص مولکولار آن‌ها به صورت روتین، منجر به یک تصمیم‌گیری مناسب در مدیریت درمان لوسمی میلوئیدی حاد شده و از اجرای پروتکل‌های درمانی کم فایده، ایجاد مقاومت به درمان و عودهای مکرر جلوگیری به عمل می‌آورد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران جهت حمایت مالی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران جهت آزمایش‌ها و از سازمان انتقال خون ایران و بیمارستان شریعتی به جهت تامین نمونه‌های لازم نهایت تشکر را دارند.

فهرست منابع

1- Savvides SN, Boone T, Andrew Karpluz P. FLT3 Ligand structure and unexpected Commonalities of helical bundles and cystein knots . Nat Struct Biol 2000; 7:486-491.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

aspartic acid 814 in the function and expression of c-kit receptor tyrosine kinase. J Biol Chem 1996;271:3347-3350.

2- Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y, et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. Blood 1993; 82:1110-1119.

13- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood 2002;100: 1532-1542.

3- deLapeyriere O, Naquet P, Planche J, Marchetto, S., Rottapel, R. Expression of FLT3 tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues. Differentiation 1995;58:351-359 .

14- Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H. Tandem-duplicated FLT3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. Oncogene 2000;19:624-631.

4- Rosnet O, Birnbaum D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. Crit Rev Oncog 1993;4:595-613 .

15- Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. Leukemia 1998;12:1333-1337.

5- Agnes F, Shamoon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. Gene 1994;145:283-288 .

16- Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, et al. FLT3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. Blood 2000;96:3907-3914.

6- Birg F, Rosnet O, Carbuccia N, Birnbaum D. The expression of FMS, KIT and FLT3 in hematopoietic malignancies. Leuk Lymphoma 1994;13:223-227 .

17- Choi Y, Kim HJ, Park BH, Min WS, Kim CC. Novel mutations in the FLT3 gene in adult patients with refractory acute myeloid leukemia. Br J Hematol 2005; 108:322-326.

7- Birg F, Courcoul M, Rosnet O, Bardin F, Pébusque MJ, Marchetto S, et al. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. Blood 1992;80:2584-2593.

18- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y , Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood 2001;97:2434-2439.

8- Piacibello W, Fubini L, Sanavio F, Brizzi MF, Severino A, Garetto L, et al. Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. Blood 1995;86:4105-4114.

19- Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. Blood 2002;99:310-318.

9- DaSilva N, Hu ZB, Ma W, Rosnet O, Birnbaum D, Drexler HG. Expression of the FLT3 gene in human leukemia-lymphoma cell lines. Leukemia 1994;8:885-888 .

20- Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. Br J Haematol 2000;111:190-195.

10- Kaspers GJL, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJP. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. Blood 1995;85: 751-756.

21- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia 1996;10:1911-1918.

11- Zwaan CM, Kaspers GJL, Pieters R, Ramakers-Van Woerden NL, den Boer ML, et al. Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB-types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000;96: 2879-2886.

22- Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. Leukemia

12- Moriyama Y, Tsujimura T, Hashimoto K, Morimoto M, Kitayama H, Matsuzawa Y, et al. Role of

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

1999;13:38-43.

23- Williams DE. In vivo effects of FLT3 ligand . Blood 1997;90:5022a.

24- Fröhling S, Breitruck J, Schlenk R, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, et al. FLT3 internal tandem duplications and survival in adult acute myeloid leukemia: analysis of 188 intensively treated patients . Blood 2001;89:717a.

25- Rombouts WJ, Blokland I, Lowenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the FLT3 gene. Leukemia 2000;14:675-683.

26- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. Nat Genet 2002;30:41-47

27- Fenski R, Flesch K, Serve S, Mizuki M, Oelmann E, Kratz-Albers K. Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. Br J Haematol 2000;108:322-330.

28- Kelly LM, Yu JC, Boulton CL, Apatira M, Li J, Sullivan CM. CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). Cancer Cell 2002;1:421-432.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

Diagnosis of FLT3 Mutations Including Internal Tandem Duplication and D835 Aspartic Acid Point Mutation in Patients with Acute Myeloid Leukemia

***F. Zaker, PhD[I] M. H. Mohammadi. MSc[II] A. Kazemi, PhD[III]**
M. Bakhshayesh, MSc[IV]

Abstract

Background and Aim: Molecular basis of Acute Myeloid Leukemia (AML) involves mutations in regulatory genes of cellular proliferation and differentiation.Mutation in tyrosine kinase receptor gene of FLT3 occurs in high frequency in AML, resulting in proliferation and abnormal survival of leukemia cells. Mutations in Internal Tandem Duplication (ITD) and D835 of FLT3 gene are associated with poor prognosis .The aim of this study was to diagnose and determine the frequency of this mutation in AML.

Materials and Methods: This descriptive - observational study was performed on 101 AML patients for mutations in exon 11,12 and interon 11 of ITD and D835 mutation in exon 20 of FLT3 receptor gene using PCR .Mutation in ITD was observed using PCR products run on acrylamid gel 8% and compared to marker. PCR products of D835 mutation on genomic DNA were studied using ECORV restriction enzyme and RFLP technique.

Results: ITD mutation was observed in 18% of AML studied patients with differences in subgroups of FAB. Also 6% of the patients showed D835 mutation with difference in subgroups of FAB.

Conclusion: This study revealed that mutations in FLT3 gene occurr in substantial number of AML patients. Therefore ,molecular diagnosis of these mutations prior to treatment leads to a better decision making for the therapeutic protocol.

Key words: 1) AML (Acute Myeloid Leukemia) 2) FLT-3 (Fms Like Tyrosin kinase 3) ITD (Internal Tandem Duplication) 4) D835 (Aspartic Acid 835) 5) PCR (Polymerase Chain Reaction)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

This article is a summary of the thesis by M.H Mohammadi for the degree of MSc in Hematology under supervision of F.Zaker, Ph.D. and consultation with A.Kazemi, Ph.D. (2006)

I) *Associate Professor of Hematology, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Crossing of Hemmat and Chamran Expressways, Iran University of Medical Sciences and Health services Tehran, Iran (* Corresponding Author)*

II) *MSc in Hematology, Faculty of Paramedical Sciences, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran*

III) *Associate Professor of Hematology, Faculty of Paramedical Sciences, Iran University Of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran*

IV) *MSc in Parasitology, Cellular and Molecular Research Center, Iran University Of Medical Sciences and Health Services, Tehran Iran*